



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

Instituto de Ecología

**“GENÉTICA DE POBLACIONES COMPARADA  
ENTRE *Datura stramonium* Y SU HERBÍVORO  
ESPECIALISTA *Lema trilineata*”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A :

**GUADALUPE ANDRACA GÓMEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI

MÉXICO, D.F.

FEBRERO DEL 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. La investigación fue financiada con fondos del proyecto SEP-CONACYT 81490. Titulado “Evolución de la defensa en plantas contra sus enemigos naturales”.

Quiero agradecer al Dr. Juan Fornoni por facilitarme todas las herramientas para realización de esta tesis.

Gracias a los miembros de mi comité tutorial Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Jorge González Astorga y Dr. Ken Oyama por esos comentarios acertados que hicieron que la realización de este trabajo avanzara satisfactoriamente.

A Dr. Antonio González, Dr. Daniel Piñero por integrarse como sinodales, gracias por los consejos para que esta tesis quedara lo mejor posible.

Jonathan Hernández, Etzel Garrido, Armando López gracias por cooperar en la colecta de material.

Los análisis de microsatélites no hubieran sido exitosos sin la ayuda de mucha gente, al Dr. Daniel Piñero gracias abrimme las puertas del Laboratorio de Genética y Evolución unos meses para que aprendiera y montara la técnica de microsatélites, Alejandra Vázquez-Lobo quien amablemente dedicó parte de su tiempo para que aprendiera la técnica; Ana Wegier, Lev Jardón, Alejandra Moreno sin ustedes entender este mundo de los microsatélites hubiera sido un poco más complicado gracias.

Erika Aguirre y Laura Espinosa gracias por su apoyo con las secuencias.

Fabiola Ramírez gracias por ser mi última tabla de salvación en la tortuosa elaboración y lectura de los geles de acrilamida.

A los miembros de los Laboratorios de Genética ecológica y Evolutiva, Mariana, Pil, Vania, Laura Lorena; e Interacción Planta Animal Lislíe, Etzel, Jonathan, Carlitos, Luz, Diego, Betzabé, Paula, Angélica, Mariana, Jessica gracias por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia grata.

A mi familia mis papas, Guadalupe y Juan, mis hermanas, Martha y Adriana, mi Tía Virus, gracias por involucrarse en mis proyectos y ayudarme a no claudicar  
Gracias David por que tu impulso ha sido muy importante para dar lo mejor de mi y disfrutar este proceso de formación.

## INDICE

Agradecimientos	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
MÉTODO	8
Sistema de estudio	8
Colecta de poblaciones	9
Obtención de datos genéticos	11
Análisis estadístico	14
RESULTADOS	16
Genética de poblaciones de <i>Lema trilineata</i>	16
Genética de poblaciones de <i>Datura stramonium</i>	19
Efecto del herbívoro <i>Lema trilineata</i> en la diversidad y estructura genética de <i>Datura stramonium</i>	23
Correlación de la estructura genética de <i>Datura stramonium</i> y <i>Lema trilineata</i>	24
DISCUSIÓN	29
BIBLIOGRAFIA	34
Apéndice I	40
Apéndice II	43
Apéndice III	44
Apéndice IV	46

## RESUMEN

Comparar el flujo génico y la estructura poblacional entre planta y herbívoro es importante para determinar la escala geográfica a la cual puede ocurrir adaptación local y coevolutiva entre especies. En este estudio se utilizaron marcadores neutrales para estimar la estructura genética de *Datura stramonium* y de su herbívoro especialista *Lema trilineata* para 18 poblaciones de la planta y 13 del herbívoro distribuidas en el centro y poniente de México. Además se correlacionaron las matrices de distancias genéticas de las especies. Los resultados indicaron que *L. trilineata* presenta un porcentaje de polimorfismo levemente menor (54% a 81%), al de su hospedero *D. stramonium* (20% y 100%). Las poblaciones de la planta presentan mayores niveles de diferenciación ( $R_{ST} = 0.29$ ) comparados con los del herbívoro ( $F_{ST} = 0.10$ ). A nivel global, los análisis de aislamiento por distancia no detectaron un patrón significativo para *L. trilineata* ( $r = 0.084$ ,  $p = 0.282$ ) y *D. stramonium* ( $r = -0.142$ ,  $p = 0.016$ ). Tampoco se encontró una correlación entre las estructuras genéticas de ambas especies ( $r = -0.06$ ,  $p = 0.628$ ). Sin embargo el análisis de correlación genética a escala geográfica mas pequeña, considerando las cuencas hidrológicas, detectó un patrón significativo para el grupo de poblaciones de la cuenca del Balsas ( $r = 0.831$ ,  $p = 0.009$ ) y para aquellas presentes en la cuenca del Pánuco ( $r = 0.636$ ,  $p = 0.056$ ). Para ambas cuencas no se detectaron patrones de aislamiento por distancia para la planta y su herbívoro. Los resultados muestran a escala geográfica pequeña, el flujo génico no restringirá el proceso de adaptación local recíproca o coevolución a nivel poblacional.

## ABSTRACT

Evaluating genetic structure and gene flow of natural enemies and their host populations is important to determine the geographic scale at which local adaptation and coevolution may occur. Here, we first determined the population genetic structure of the herbivorous insect *Lema trilineata* and its host plant *Datura stramonium* using neutral markers data from 13 and 18 populations respectively in Mexico. Then, we evaluated if the population genetic structures of both interacting species were correlated. The results indicated that *L. trilineata* presents a polymorphism percentage of 54% to 81% while *D. stramonium* presents a percentage of 20% to 100%. Additionally, the host populations showed higher differentiation level ( $R_{ST} = 0.29$ ) than that present in the herbivore ( $F_{ST} = 0.10$ ). When all the populations were considered, there was no significant correlation between geographic and genetic distances for neither *L. trilineata* ( $r = 0.084$ ,  $p = 0.282$ ) nor *D. stramonium* ( $r = -0.142$ ,  $p = 0.016$ ). Moreover, host and herbivore genetic distance matrices were uncorrelated. However, when populations were re-organized according to the basins present in Mexico, we found a significant correlation in population genetic structure between hosts and herbivores for the basin of Balsas ( $r = 0.831$ ,  $p = 0.009$ ) and Panuco ( $r = 0.636$ ,  $p = 0.056$ ), although there was no isolation by distance among basins for neither *L. trilineata* nor *D. stramonium*. These results suggest that in the study system patterns of migration would not constrain local adaptation and coevolution between interacting populations at small geographic scale.

## INTRODUCCIÓN

La estructura geográfica y el flujo génico son componentes importantes en la evolución de las interacciones y el proceso coevolutivo (Thompson 1994). Evidencia teórica y empírica muestra que las interacciones ocurren en ambientes heterogéneos espacial y temporalmente, ya que las características ambientales y ecológicas de cada población afectan la evolución de la interacción (Burdon y Thrall 1999).

Basado en la presencia de esta heterogeneidad, Thompson (1999; 2005) postula el mosaico geográfico de la coevolución, teoría que se resume en tres componentes: 1) Diferencias geográficas en la coevolución.- se refiere a que la selección varía entre poblaciones ya que hay diferencias en cómo la adecuación depende de la distribución de genotipos en otras especies, 2) Existen puntos calientes coevolutivos, que es el subconjunto de poblaciones donde la selección recíproca ocurre realmente, y puntos fríos, donde o no hay adaptación o la adaptación es no recíproca.; 3) Mezcla de rasgos.- la estructura genética de las especies que coevolucionan también cambian con nuevas mutaciones, flujo génico, deriva génica y extinción local. Modelos teóricos metapoblacionales muestran que los niveles de resistencia del huésped y los patrones de adaptación local dependen de la tasa de mutación y del flujo génico tanto del huésped como del parásito (Gandon y Multikainen 2002). Si el flujo cambia las frecuencias en dirección opuesta a la Selección Natural habría una restricción a la divergencia adaptativa (Lenormand 2002).

Una manera de evaluar indirectamente como el flujo génico y la estructura genética poblacional condicionan el proceso de adaptación local recíproco entre especies que interactúan es utilizar marcadores neutrales para estimar la estructura poblacional correlacionada entre especies (1965) (Thompson 2005; Mikalakis et al. 1993; Multikainen y

Koskela 2002; Ren et al. 2008; Dybdal y Lively 1996; Martínez et al. 1999; Parker y Spoerke 1998). Cuando la estructura genética de especies que interactúan no están correlacionadas, es probable que los patrones de dispersión y extinción difieran entre especies. Por el contrario cuando las estructuras genéticas de ambas especies están correlacionadas, es posible suponer cierto grado de continuidad histórica en la interacción (Parker y Spoerke 1998) una correlación significativa sin embargo puede ser resultado de (1) patrones similares de flujo génico entre las especies, o (2) desequilibrio de ligamiento entre los marcadores moleculares y loci bajo selección involucrados en la interacción (Gandon et al. 1996; Multikainen y Koskela 2002) por lo tanto, combinar el análisis de aislamiento por distancia con las estructuras genéticas puede ayudar a determinar el potencial de adaptación local entre especies que interactúan. A pesar de la importante cantidad de evidencias sobre coevolución a nivel macroevolutivo entre plantas y herbívoros (Erlich y Raven 1964; Futuyma y Slatkin 1983; Winkler y Mitter 2008) existe muy poca evidencia que apoye las predicciones de la teoría coevolutiva o a nivel poblacional (Berenbaum y Zonger 1992)

Análisis previos de genética de poblaciones no han encontrado correlación de la estructura genética de las especies interactuantes (Ren et al. 2008; Anderson et al. 2004; Mulvey et al 1991; Michalakis et al. 1993; Martínez et al. 1999; Multikainen y Koskela 2002). En estos, casos se encontró que uno de los dos interactuantes presentaba mayor flujo y el patrón de flujo génico no se ajustaba a un modelo de aislamiento geográfico. Existen casos en los que se ha encontrado una correlación positiva entre las estructuras genéticas (McCoy et al. 2005; Nadler 1995; Dybdahl y Lively 1996; Delmotte et al. 1999). Y los niveles de diferenciación genética de las especies interactuantes fue similar. De los trabajos de genética comparada desarrollados hasta el momento pocos han estudiado el efecto planta herbívoro (Michalakis et al. 1994; Anderson et al. 2004 y Ren et al. 2008), ninguno encontró una correlación positiva entre las



estructuras genéticas. Dada la ausencia de evidencia que apoye la expectativa sobre coevolución a través de adaptación local recíproca a nivel poblacional entre plantas y herbívoros, en este estudio se planteó examinar la estructura genética conjunta de la planta anual *Datura stramonium* (Solanaceae) y uno de sus herbívoros, *Lema trilineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) para determinar la escala geográfica a la cual el flujo genético permitiría la adaptación local. Estudios previos en este sistema han detectado que la variación genética en la resistencia de la planta reduce fuertemente la supervivencia del herbívoro y que éste presenta variación genética en su capacidad de resistencia a la planta (Garrido y Fornoni 2006). En *D. stramonium* existe evidencia de variación genética aditiva para caracteres defensivos contra los herbívoros (Fornoni et al. 2003; Valverde et al. 2003), selección natural actuando sobre la defensa (Núñez-Farfán y Dirzo 1994; Shonle y Bergelson 2000), y adaptación local de la planta relacionada con atributos de defensa contra herbívoros entre poblaciones ubicadas a 30 Km. de distancia una de otra (Fornoni et al. 2003; 2004). Estudios recientes también han demostrado que el herbívoro presenta variación en sus niveles de adaptación local a su hospedero (Garrido y Fornoni, manuscrito). Por lo tanto, para el sistema de estudio *D. stramonium* – *L. trilineata* la evidencia existente sugiere que ambas especies están ejerciendo presiones de selección recíprocas que podrían promover un proceso coevolutivo a nivel poblacional.

Los objetivos que este estudio se planteo fueron (1) describir la estructura genética de la planta *D. stramonium* y su herbívoro *L. trilineata* en el Centro de México, (2) determinar si los niveles de diversidad genética y diferenciación genética son más altos entre las poblaciones que coexisten con el herbívoro respecto de las que no lo hacen; (3) determinar si existe una asociación positiva entre las distancias genéticas de las poblaciones de la planta y las de su herbívoro.

## METODO

### Sistema de estudio

*Lema trilineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) escarabajo holometábolo de forma alargada con la cabeza y el tórax más angosto que los élitros. La parte dorsal presenta un color amarillo claro testáceo básico. Las hembras son ligeramente más grandes que los machos, siendo esta característica la única diferencia cuantitativa descrita asociada al dimorfismo sexual (Kogan y Goeden 1970). Este coleóptero es considerado el herbívoro más importante de *Datura stramonium* en México y algunas partes de Norteamérica. Todo el ciclo de vida del insecto se desarrolla asociado a su hospedero. El estado larval es el que consume la mayor parte del tejido foliar. Luego de aproximadamente un mes de germinar las plantas con el inicio de la temporada de lluvia, emergen los adultos del escarabajo (Núñez-Farfán y Dirzo 1994). Inmediatamente comienzan a aparearse y a ovipositar cumpliendo el ciclo de vida en aproximadamente treinta días. Por lo tanto, cada generación de la planta equivale a 3-5 generaciones del escarabajo. Casi al final de la temporada de crecimiento de la planta, las larvas del último estadio pupan en el suelo debajo de las plantas y permanecen en diapausa hasta el siguiente año. Su capacidad de dispersión no se ha estudiado de manera detallada

*Datura stramonium* (Solanaceae) es una hierba anual conocida comúnmente en México como “toloache”. En general se encuentra en sitios con alta perturbación humana en zonas abiertas, a orillas de los caminos, zonas de cultivo y basurales (Weaver y Warwick 1984). Su morfología floral y su antesis nocturna sugieren que es polinizada por esfíngidos, presenta una alta capacidad de autofertilización (Motten y Antonovics 1992). Las poblaciones de *D. stramonium* varían en tamaños desde menos de 10 individuos hasta no más de 1000 individuos (obs. pers.). Su distribución es más amplia que la de *L. trilineata* por lo que no todas sus poblaciones interactúan con el insecto.

### *Colecta de poblaciones*

Durante el verano de 2005 y 2006 se realizaron colectas de individuos de 13 poblaciones de *Lema trilineata* y 18 de *Datura stramonium* en el centro y sur de México (Tabla 1). Se muestrearon de 20 a 40 individuos del insecto y la planta por población. Los ejemplares muestreados fueron transportados al laboratorio donde fueron preservados en un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesados. Las poblaciones se ubican en los Estados de Puebla, Hidalgo, Distrito Federal, Estado de México, Michoacán, Morelos y Guerrero (Fig. 1)

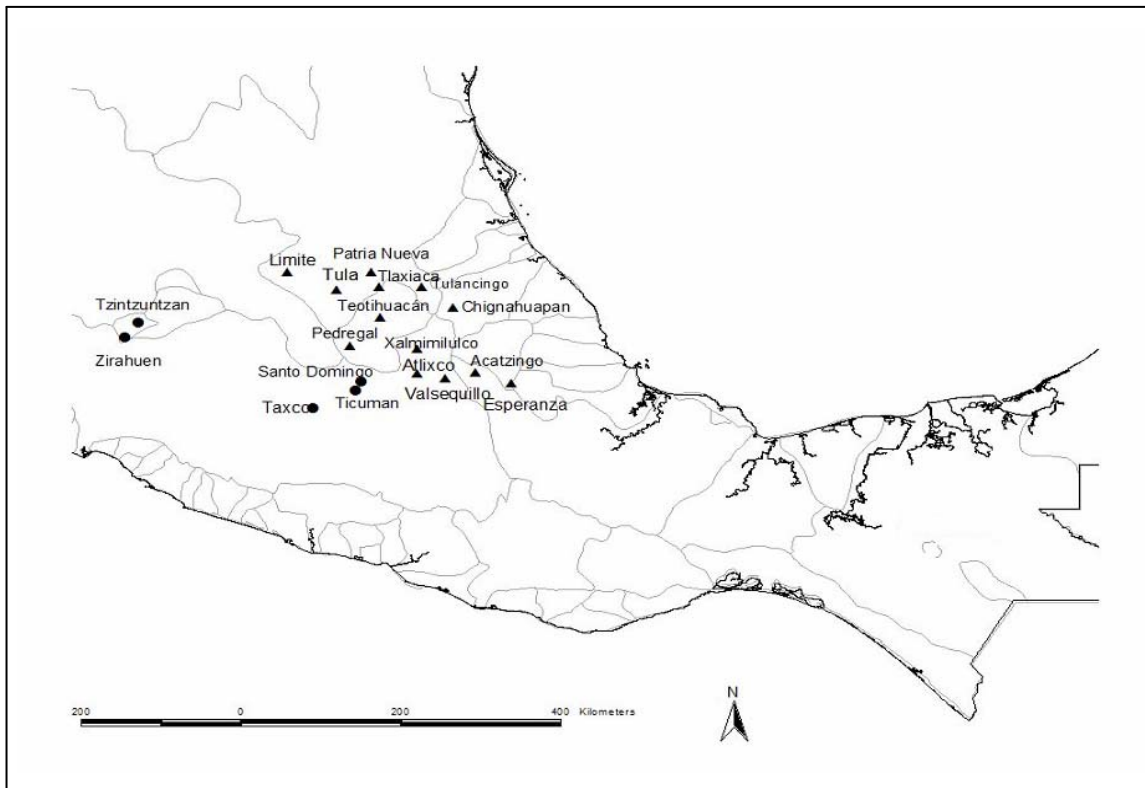


Figura 1. Mapa del centro de la República Mexicana donde se indican las poblaciones de *Datura stramonium*. Con (▲) y sin (●) la presencia de *Lema trilineata*.

Tabla 1. Ubicación geográfica y características climáticas de las localidades colectadas de *Lema trilineata* y *Datura stramonium*. ((P) Precipitación anual, (T) Temperatura media anual. García 1981)

Población	Coordenadas	Altitud	P (mm)	T	Presencia de <i>L. trilineata</i>
Pedregal, Distrito Federal	19°19'39";99°11'32"	2510	691.0	16.3°C	Si
Límite, Estado de México- Querétaro	20°16'34";99°53'56"	2200	580.3	16.7°C	Si
Teotihuacan, Estado de México	19°47'27";98°51'04"	2300	563.3	14.9°C	Si
Taxco, Guerrero	18°32'38";99°36'18"	1600	1432.9	21.6°C	No
Patria Nueva, Hidalgo	20°16'40";98°57'05"	2000	435.0	16.7°C	Si
Tulancingo, Hidalgo	20°05'00";98°23'02"	2250	543.3	14.8°C	Si
Tlaxiaca, Hidalgo	20°07'03";98°45'10"	2300	385.4	14.2°C	Si
Tula, Hidalgo	20°02'50";99°20'36"	2050	618.7	17.5°C	Si
Tzintzuntzan, Michoacán	19°37'43";101°34'71"	2200	996.0	16.3°C	No
Zirahuen, Michoacán	19°27'60";101°43'40"	2170	1182.0	15.7°C	No
Santo Domingo, Morelos	18°59'54";99°06'95"	1200	1463.0	19.9°C	No
Ticuman, Morelos	18°52'14";99°04'07"	960	802.0	23.1°C	No
Acatzingo, Puebla	18°58'59";97°47'00"	2160	757.0	18.7°C	Si
Atlixco, Puebla	18°58'53"; 98°26'09"	1840	876.6	17.9°C	Si
Chignahuapan, Puebla	19°49'32";98°02'04"	2300	1070.4	14.7°C	Si
Esperanza, Puebla	18°51'20";97°22'26"	2460	801.0	13.4°C	Si
Valsequillo, Puebla	18°48'24";97°57'54"	2200	471.8	17.3°C	Si
Xalmimilulco, Puebla	19°17'11";98°26'12"	2270	804.6	17.7°C	Si

### ***Obtención de datos genéticos.***

Para la descripción de la estructura genética de ambas especies se utilizaron marcadores codominantes, isoenzimas en acetato de celulosa para *L. trilineata* y microsatélites nucleares para *D. stramonium*. Ambos marcadores presentan como ventaja que permiten distinguir de manera confiable entre homócigos y heterócigos. Los microsatélites son altamente variables, con tasas de mutación alta, lo cual permite establecer fácilmente la identidad de los individuos, esto junto con su carácter selectivamente neutro ha hecho que sean ampliamente utilizados en los estudios de genética de poblaciones (Goldstein y Pollock, 1997). En insectos se ha encontrado alta variabilidad en isoenzimas (Krafsur 1999).

Los escarabajos fueron macerados con 100  $\mu$ l de buffer pH 7.0 (0.05 M de tris, 0.05M de EDTA, 2-Mercaptoetanol). Se corrieron en el sistema buffer CAAPM (Hebert y Beaton 1993) con el que se tuvo buena resolución para 9 enzimas. El sistema se corrió durante dos horas a temperatura ambiente a 50V y 15mA (Tabla 2, Apéndice I).

Tabla 2. Enzimas que presentaron actividad y número de loci encontrados para las poblaciones de *Lema trilineata* colectadas en México.

Enzima	Abreviatura	Numero de loci	Número de alelos
Arginin kinasa	ARK	1	3
Esterasa	EST	2	3
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PDH	1	2
Glucosa-6-fosfato isomerasa	GPI	1	2
Isocitrato deshidrogenasa	IDH	1	3
Malato deshidrogenasa	MDH	2	2
Enzima Málica	ME	1	2
Mannosa-6-fosfato deshidrogenasa	MPI	1	3
6- fosfogluconato deshidrogenasa	6PGDH	1	3

El caso de *Datura stramonium* se utilizaron microsatélites nucleares diseñados específicamente para esta especie por custom genetic markers ([www.genetic-id-services.com](http://www.genetic-id-services.com)).

La extracción de DNA se realizó utilizando el protocolo de miniprep modificado por Vázquez-Lobo (1996) (Apéndice II). Las muestras de DNA se almacenaron en un ultracongelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para luego llevar a cabo las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Thermo, en un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ . La solución que se preparó para realizar esta reacción por individuo fue: 2.5  $\mu\text{l}$  de buffer para PCR 10x, 0.75  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1  $\mu\text{l}$  de la mezcla 10mM de los 4 dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato), 1  $\mu\text{l}$  de primer F 10 pM, 1  $\mu\text{l}$  de primer R 10 pM, 1 U de Taq polimerasa, 2  $\mu\text{l}$  de DNA genómico y el volumen de agua bidestilada estéril necesario para lograr un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ . El programa de reacción de PCR fue el siguiente: Desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por

5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1min, alineamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y extensión final a 72° por 5 min.

Los productos de PCR fueron corridos en geles de acrilamida al 6 % y 8% dependiendo del grado de resolución y se tiñeron con la técnica de AgNO<sub>3</sub> (Apéndice III). En la Tabla 3 se muestran los 5 primers que amplificaron y presentaron variación para las 18 poblaciones de *Datura stramonium*. Los primers que tienen un asterisco fueron aquellos que se corrieron en geles de acrilamida nativos, los otros productos se corrieron en geles desnaturalizantes (Apéndice III). Los geles de acrilamida desnaturalizantes permiten ver con más claridad las diferencias entre los alelos presentes. En el otro caso la resolución fue buena con los geles nativos.

Tabla 3. Lista de primers de microsatélite nucleares estandarizados para *Datura stramonium*, los microsatélites marcados con asterisco corrieron en geles nativos.

Microsatélite	Secuencia repetida	Primer 5-3	Tipo
E1	(GTT) <sup>4</sup>	GTGAGCTGAGTGTTGCTCG GCAGCCAAAATAAATAACCAGAGG	Trinucleotido
E9	(GTT) <sup>6</sup>	AGGATACTGGTGGGGTTCAG TCAAGAAAGCCTGTGGAAATTATG	Trinucleotido
Eap23	(CTT) <sup>9</sup> ...(CTT) <sup>9</sup> ...(A TC) <sup>10</sup>	TCCCCTTTGTCCCATTTCC ACTTCAGCAGAGCGAGAAAC	Compuesto
F1*	(ACTG) <sup>4</sup>	AGGCAGAGCGTTCCTTCAATAC ACCATTAAGTGCCAGACTCC	Tetranucleotido
G8*	(GT) <sup>8</sup>	GATCCAAACCTTGCGGGTG AGCAAGATATCAAGAATGTGCAAG	Dinucleotido

### ***Análisis estadístico***

Para ambas especies se estimó por población la proporción y el número de loci polimórficos (%P) la heterocigosidad promedio esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) el índice de fijación o coeficiente de endogamia ( $F$ ) ( $F=1-(H_o/ H_e)$ ) (Wright 1922). Cuando  $0<F<1$  se predice un exceso de homócigos con respecto a la hipótesis nula (equilibrio Hardy-Weinberg  $F=0$ ) mientras que cuando  $-1<F<0$  se predice un exceso de heterócigos. Los descriptores de la variación genética se obtuvieron con el programa TFPGA para *L. trilineata* y con el programa ARLEQUIN 3.0 para *D. stramonium*.

Para poder caracterizar la estructura genética de las especies se estimaron los estadísticos  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  (Wright 1922). De acuerdo con Weir y Cockerman (1984), la significancia de los estadísticos F por población y especie se obtuvieron mediante la prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) (Li y Horvitz 1953) en la cual  $\chi^2= F_{IS}N(k-1)$  o bien  $\chi^2=F_{IT}N(k-1)$  para ambos con  $k(k-1)$  grados de libertad, y  $\chi^2=2NF_{ST}(k-1)$  (Workman y Niswander 1970) con  $(k-1)(s-1)$  grados de libertad; donde k es el número de alelos y s el número de subpoblaciones a analizar.

Para *D. stramonium* se utilizó el análisis propuesto por Slatkin (1995) que estima la diferenciación entre poblaciones,  $R_{ST}$ , que toma en cuenta las diferencias en el tamaño de los alelos entre marcadores de microsatélites. Posteriormente se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de *D. stramonium* (Michalakis y Excoffier 1996). Dado que en cinco poblaciones de la planta no estuvo presente el herbívoro, el AMOVA se realizó separando por un lado para el grupo de poblaciones con *L. trilineata* y por otro poblaciones sin *L. trilineata*.

El flujo génico entre las poblaciones para ambas especies se estimó de manera indirecta calculando las  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones. Ya que es una manera indirecta de calcular el número de migrantes (Slatkin 1995)



Para poner a prueba la hipótesis de aislamiento por distancia se realizó una correlación entre pares de distancias genéticas y geográficas usando el procedimiento de permutaciones de Mantel (Mantel 1967, Smouse et al. 1986). El indicador de distancia genética que se utilizó fue  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  que es la medida de correlación más adecuada (Rousset 1997). El análisis se realizó con ayuda del Macro para excel XLSTAT.

**Análisis de las distancias genéticas.-** Se construyeron árboles de distancia genética por especie usando el método de UPGMA mediante el programa TFPGA. Finalmente para comparar la estructura genética de ambas especies se aplicó una correlación entre las matrices de valores de distancias genéticas de ambas especies utilizando una prueba de Mantel (Smouse et al. 1986). Un valor positivo significativo para la correlación indicaría que ambas especies están sujetas a una dinámica similar de diferenciación y aislamiento apoyando la hipótesis de que ambas especies han estado coevolucionando a nivel local como resultado de presiones selectivas recíprocas, bien que los loci utilizados están en desequilibrio de ligamiento con genes que se encuentran bajo selección.

## RESULTADOS.

### Genética de poblaciones de *Lema trilineata*

De las 9 enzimas que presentaron actividad electroforética para *L. trilineata*, todas fueron polimórficas y dos de ellas (EST y MDH) presentaron dos loci, incrementando a 11 el total de loci polimórficos. El porcentaje de polimorfismo dentro de las poblaciones varió desde 54 a 90 % y la proporción de heterocigosis de 0.115 a 0.260. Los valores positivos y significativos ( $p < 0.05$ ) del índice de fijación ( $F$ ) indican que para todas las poblaciones hay menos heterocigos de los esperados bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje promedio de polimorfismo %P, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), esperada ( $H_e$ ) e índice de fijación ( $F = 1 - (H_o / H_e)$ ) de las 13 poblaciones de *Lema trilineata* en México. Estos parámetros fueron calculados con los 11 loci.

Población	% P	$H_o$	$H_e$	$F$
Acatzingo, Pue.	81.82	0.264	0.375	0.298
Atlixco, Pue.	54.54	0.136	0.209	0.380
Chignahuapan, Pue.	90.91	0.239	0.398	0.399
Esperanza, Pue.	63.64	0.126	0.189	0.337
Límite, Qro-Edo de Méx.	63.64	0.202	0.278	0.271
Patria Nueva, Hgo.	81.82	0.258	0.361	0.287
Pedregal. D. F.	72.73	0.248	0.309	0.196
Teotihuacan, Edo. De Méx.	72.73	0.212	0.294	0.281
Tulancingo, Hgo.	72.73	0.192	0.312	0.384
Tlaxiaca, Hgo.	54.55	0.182	0.214	0.149
Tula, Hgo.	72.73	0.261	0.290	0.103
Valsequillo, Pue.	63.64	0.115	0.278	0.585
Xalmimilulco, Pue.	81.82	0.154	0.266	0.421

El análisis de la estructura genética indicó que la mayoría de las enzimas utilizadas presentaron menor cantidad de heterocigosis de la esperada por Hardy-Weinberg ( $F_{IS} = 0.3248$ ,

Tabla 5). Sólo para IDH y APK se encontraron valores negativos indicando un exceso de heterócigos. El valor promedio de  $F_{ST}$  estimado para los 11 loci fue significativo pero moderadamente bajo.

Tabla 5. Estadísticos  $F$  de Wright por enzima para las 13 poblaciones de *Lema trilineata* en México (todos los datos tuvieron diferencias significativas respecto de cero  $p < 0.05$ ).

	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
IDH	-0.1630	0.0414	-0.2133
MDH-1	1.0000	0.1045	1.0000
MDH-2	0.4517	0.2007	0.3141
EM	0.4497	0.0813	0.4010
PGI	0.7430	0.3341	0.6140
6PGDH	0.6876	0.3045	0.5508
G6PDH	0.6126	0.1000	0.5692
EST-1	0.7347	0.0025	0.7353
EST-2	0.3589	0.0528	0.3231
MPI	0.6601	0.0554	0.6402
APK	-0.2069	0.1030	-0.3455
Todos los loci	0.3891	0.1063	0.3248
Jackknife	0.3838	0.1049	0.1559
DE	0.1444	0.0360	0.1612
95% CI	0.127-0.629	0.518-0.180	0.030-0.574

La estimación de flujo génico entre poblaciones se calculó a partir de los valores de  $F_{ST}$  entre los pares de poblaciones de *L. trilineata*. El valor mínimo fue de 0 entre Tulancingo y Teotihuacan y el máximo de 0.257 entre Patria Nueva y Atlixco (Apéndice IVa). El UPGMA construido a partir de las distancias de Nei (1978) muestra algunas concordancias geográficas en los grupos que se forman a partir de las distancias genéticas como el grupo de Teotihuacan, Tulancingo y Tula; el de Atlixco y Xalmimilulco; el de Acatzingo y Valsequillo (Fig. 2). Sin

embargo la consistencia de las ramas no es muy alta por lo que el patrón debe interpretarse con cuidado.

En la prueba de Mantel realizada entre las matrices de distancias genéticas y geográficas para analizar si existe un patrón de aislamiento por distancia arrojó un valor de  $r = 0.190$ ,  $p = 0.096$  lo cual indica que la diferenciación genética entre poblaciones no sigue un patrón geográfico de aislamiento por distancia (Fig. 3).

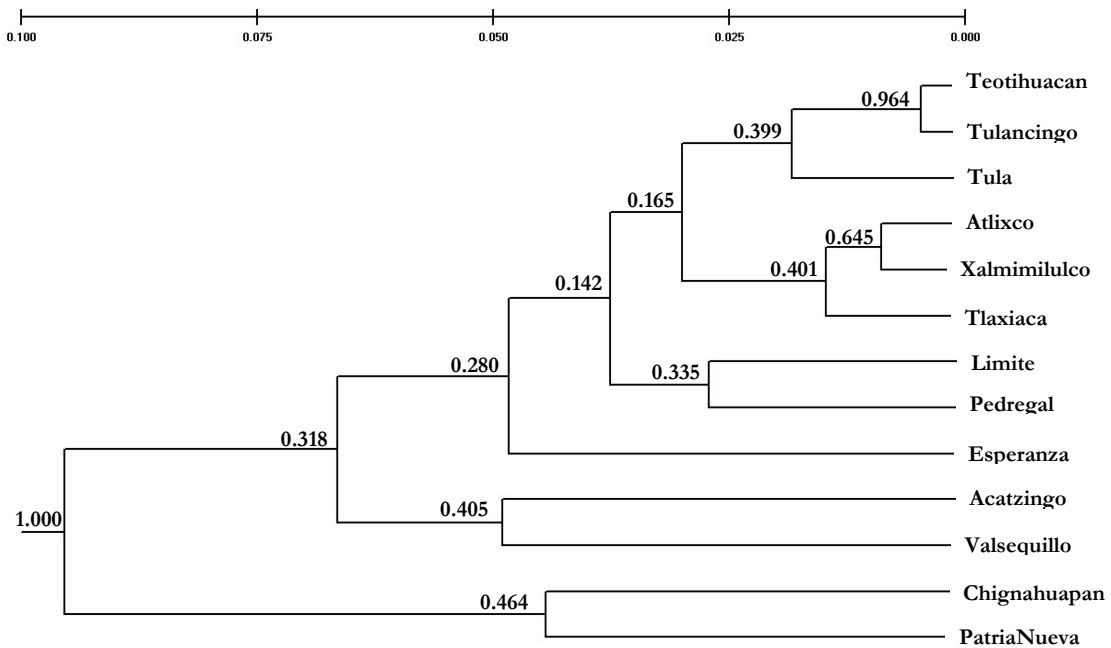


Figura 2. Árbol de distancias genéticas de Nei para *Lema trilineata* en México realizado con UPGMA, los valores en negrita indican la consistencia de la rama luego de 1,000 iteraciones de bootstrap.

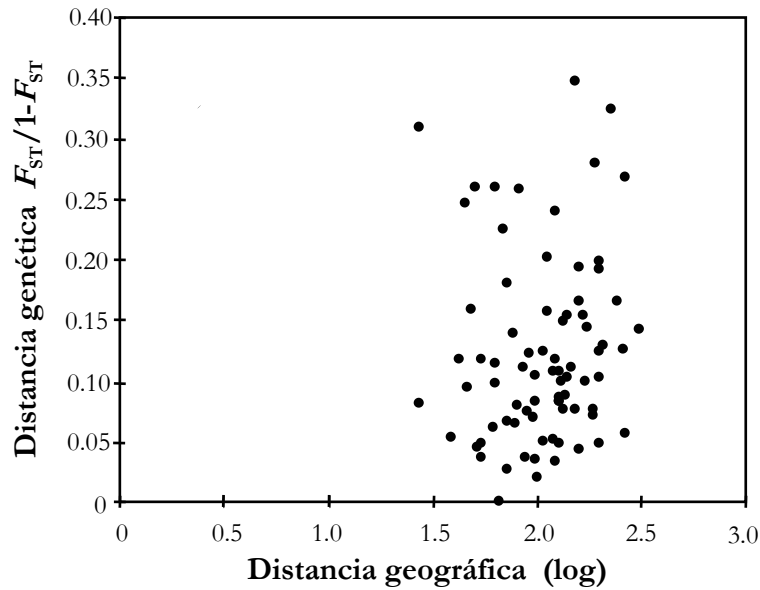


Figura 3. Relación entre los pares de distancias genéticas y geográficas entre las 13 poblaciones de *L. trilineata*.

### Genética de poblaciones de *Datura stramonium*

Cinco primers de microsatélites nucleares amplificaron y fueron variables para 520 individuos en 18 poblaciones. El porcentaje de loci polimórficos varía entre 20 y 100%. La población de Tulancingo fue la única para la cual los 5 loci fueron polimórficos. Mientras que Límite y Ticumán presentaron sólo un locus polimórfico. La heterocigosidad observada para la mayoría de las poblaciones es mayor a la esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción de Teotihuacan y Xalmimilulco donde se observaron menos heterócigos de los esperados bajo el equilibrio. Los valores negativos de  $F_{IS}$  ( $1-(H_O/H_E)$ ) muestran un exceso de heterócigos en la mayoría de las poblaciones (Tabla6), reflejando heterocigosidad fija presente en varias poblaciones.

Tabla 6. Promedio de polimorfismo %P, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), esperada ( $H_e$ ) e índice de fijación ( $F = 1-(H_o/ H_e)$ ) de las 13 poblaciones de *Datura stramonium* en México (\*poblaciones que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg)

Pob	%P	$H_o$	$H_e$	$F$
Acatzingo	80	0.400	0.334	-0.248*
Atlixco	60	0.400	0.294	-0.370*
Chignahuapan	60	0.313	0.314	0.002
Esperanza	40	0.207	0.172	-0.237*
Limite	20	0.200	0.102	-1.000*
Patria nueva	100	0.392	0.378	0.056
Pedregal	40	0.166	0.142	-0.143*
Teotihuacan	40	0.098	0.211	0.528*
Tulancingo	100	0.481	0.323	-0.541*
Tlaxiaca	60	0.400	0.283	-0.425*
Tula	80	0.438	0.327	-0.351*
Valsequillo	80	0.423	0.282	-0.498*
Xalmimilulco	60	0.147	0.206	0.292*
Santo Domingo	60	0.363	0.246	-0.545*
Taxco	60	0.400	0.289	-0.397*
Ticuman	20	0.200	0.217	0.081
Tzintzuntzan	60	0.400	0.335	-0.208*
Zirahuen	60	0.276	0.283	0.010
Media		0.319	0.349	-0.222

El análisis de AMOVA total para las 18 poblaciones de *Datura stramonium* reveló que el 29% de la variación genética está relacionada con la diferenciación entre las poblaciones  $R_{ST} = 0.29$  y el 71% con variación genética dentro de ellas (Tabla 7). El valor de  $F_{IS}$  indica que existe un ligero flujo entre todas las poblaciones. El valor promedio de  $F_{IS} = -0.311$  indicó un exceso de heterocigos dentro de las poblaciones.

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las 18 poblaciones de *D. stramonium*, (\*)  $p = 0.0001$ .

	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de varianza
Entre poblaciones	17	61753	63.13	28.90*
Dentro de poblaciones	974	151270	155.31	71.10*
Total	991	213023	218.44	

El árbol de distancias genéticas construido con UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) (Fig. 4), no muestra ningún patrón de asociación relacionada con la cercanía geográfica de las poblaciones. La prueba de aislamiento por distancia detectó una relación negativa entre las matrices de distancia genética y geográfica con un valor de  $r = -0.223$ ,  $p = 0.006$  indicando la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia para las poblaciones de *Datura stramonium* (Fig. 5).

La estimación del flujo génico y diferenciación genética se realizó mediante comparaciones pareadas de  $R_{ST}$  (Apéndice IVb). Los valores de  $R_{ST}$  para los pares de poblaciones Santo Domingo y Tlaxiaca, Atlixco y Taxco, Patria Nueva y Taxco; Atlixco y Patria Nueva, son negativos, lo que nos indica que no existen diferencias significativas entre ellas. Los valores de  $R_{ST}$  más altos fueron aquellos entre Pedregal y Esperanza ( $R_{ST} = 0.6314$ ); Pedregal y Taxco ( $R_{ST} = 0.6129$ ). Tomando en cuenta el valor máximo que puede tomar  $R_{ST}$  se puede decir que el flujo entre estos dos pares de poblaciones es muy bajo. Los valores para el resto de las poblaciones son variables.

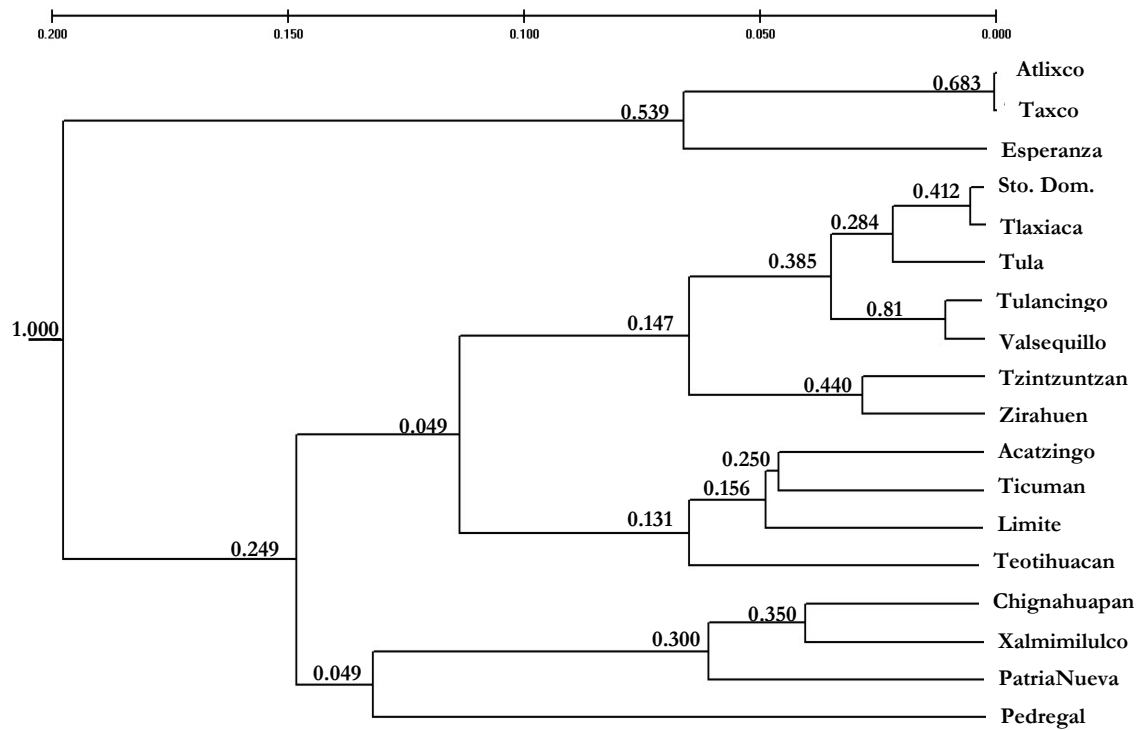


Figura 4. Árbol de distancias genéticas entre poblaciones realizado con UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) de poblaciones de *Datura stramonium* en México. Los valores en negrita indican la consistencia luego de 1,000 iteraciones de bootstrap.



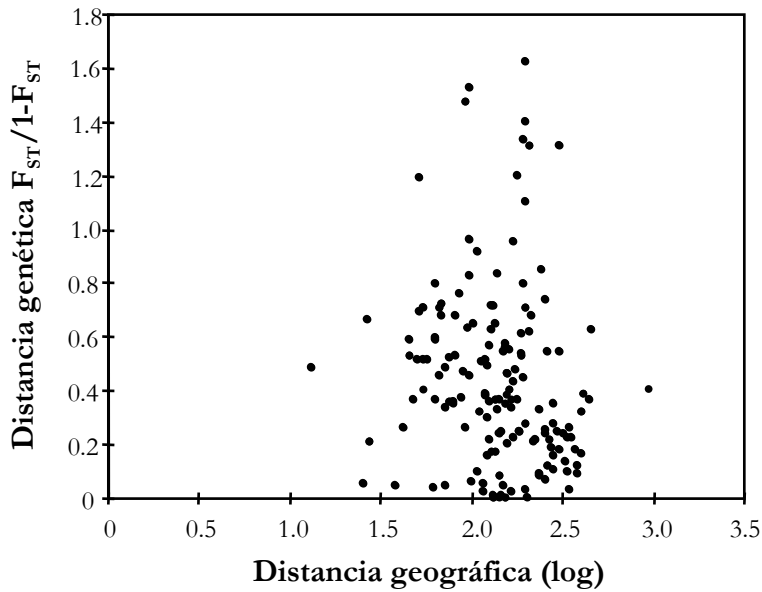


Figura 5. Relación entre los pares de distancias genéticas y geográficas entre las 18 poblaciones de *D. stramonium*.

*Efecto del herbívoro Lema trilineata en la diversidad y estructura genética de Datura stramonium*

Para evaluar si la diversidad y la estructura genética de *Datura stramonium* puede estar condicionada por la presencia de *Lema trilineata*, se analizó si existían diferencias en los valores promedio de  $H_o$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ , (Tabla 8), para las poblaciones de *D. stramonium* con y sin presencia de *L. trilineata*. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tres parámetros  $H_o$  ( $p = 0.8380$ ),  $F_{IS}$  ( $p = 0.9580$ ) y  $F_{ST}$  ( $p = 0.1420$ ). La estimación de estos valores así como la comparación se realizó en el programa FSTAT v.9.3.

Tabla 8. Heterocigosis observado ( $H_o$ ), diferenciación entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) y el índice de fijación ( $F_{IS}$ ) para poblaciones de *D. stramonium* con y sin la presencia de *L. trilineata*. Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza.

	$H_o$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
Con <i>L. trilineata</i>	0.314	0.291 (0.213, 0.360)	-0.224 (-1.000, 1.000)
Sin <i>L. trilineata</i>	0.333	0.177 (0.052, 0.236)	-0.218 (-0.349, 0.707)

El índice de fijación  $R_{ST}$  para las poblaciones de *D. stramonium* con presencia de *L. trilineata* fue 0.354 y para aquellas que no tienen *L. trilineata*  $R_{ST} = 0.260$ .

#### *Correlación de la estructura genética de Datura stramonium y Lema trilineata*

El análisis de correlación de la estructura genética de *Datura stramonium* y su herbívoro especialista *Lema trilineata* mediante la comparación de las matrices de distancias genéticas, no detectó una correlación ( $r = -0.060$ ,  $p = 0.628$ ), rechazando la hipótesis de que la interacción entre las plantas y el herbívoro ha condicionado los patrones de diferenciación genética conjunta (Fig. 6). El análisis se realizó suponiendo la ausencia de barreras importantes entre las poblaciones. Por esta razón en una segunda serie de análisis se consideró explícitamente los posibles efectos de barreras geográficas. De acuerdo con los límites superiores de altitud de las poblaciones se ubicaron las barreras geográficas potenciales (Fig. 7). Así se detectó que dos grupos importantes de poblaciones se encuentran relacionados con regiones hidrológicas como las cuencas del Pánuco (grupo 1) y del Balsas (Grupo 2).

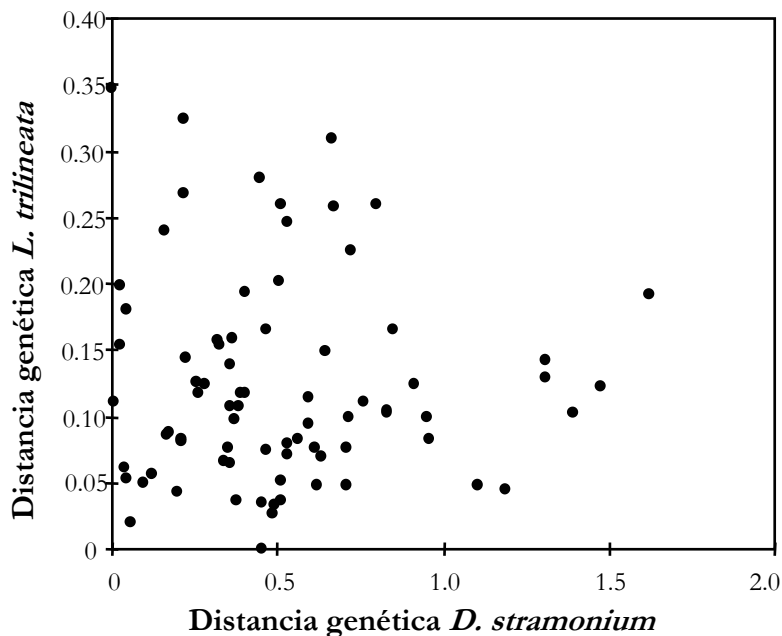


Figura 6. Correlación de Mantel entre las matrices de distancias genéticas de *Datura stramonium* y *Lema trilineata*.

En particular, las poblaciones de *D. stramonium* que se distribuyen en 4 cuencas hidrológicas.

1. **Panuco.**- Límite, Patria Nueva, Tlaxiaca, Tula, Tulancingo, Teotihuacan y Pedregal.
2. **Balsas.**- Acatzingo, Atlixco, Esperanza, Santo Domingo, Taxco, Ticuman, Valsequillo y Xalmimilulco.
3. **Lago Pátzcuaro.**- Tzintzuntzan y Zirahuen.
4. **Tecolutla.**- Chignahuapan.

Dado que en la zona central de México estas cuencas están separadas por importantes cordones montañosos que superan el límite superior en altitud de la distribución de *D. stramonium* (2,400 m) se realizaron los análisis de correlación entre las estructuras genéticas de la planta y el herbívoro para los dos grupos más importantes de las poblaciones.

Dentro de grupo 1 las poblaciones de Teotihuacan y Pedregal forman parte de la subcuenca de Lago de Texcoco y rodeadas por el eje neo volcánico funcionando como barreras orográficas, por lo que no se consideraron en el análisis del grupo 1. Basados en esta reagrupación de las poblaciones, se hicieron los análisis de aislamiento por distancia y la correlación entre la estructura genética de la planta y el herbívoro.

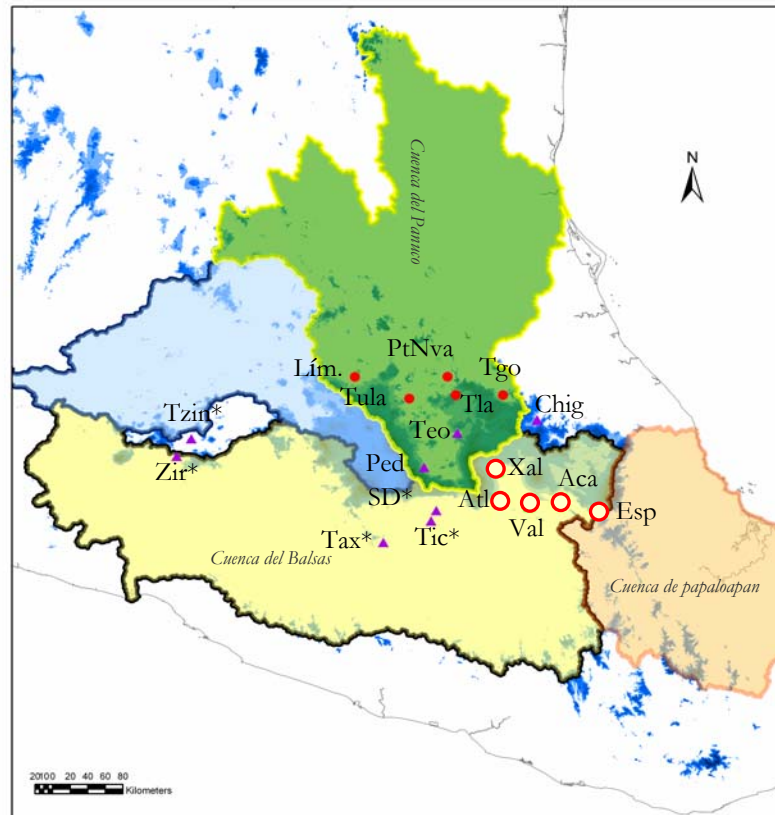


Figura 7. Mapa de distribución de poblaciones de *D. stramonium* en México. (\*) Poblaciones sin *L. trilineata*. (▲) Poblaciones que no pertenecen a ningún grupo, (●) Poblaciones del grupo 1 (Cuenca del Panuco (○) Poblaciones de grupo 2 (Cuenca del Balsas). Las zonas azul oscuro representan altitudes mayores a 2,400 m.

Los análisis de aislamiento por distancia tanto para *L. trilineata* como para *D. stramonium* mostraron que no existe un patrón significativo para ambos grupos (Tabla 9). Sin embargo al realizar la correlación entre las distancias genéticas de la planta huésped y el herbívoro se encontró un patrón marginalmente significativo para el grupo 1, y un patrón significativo para el grupo 2 (Tabla 9) (Figs. 8,9).

Tabla 9. Coeficientes de correlación y significancia para las pruebas de aislamiento por distancia y Correlación de distancias genéticas.

	Pánuco	Balsas
<i>Lema trilineata</i>	$r = -0.503, p = 0.138$	$r = 0.073, p = 0.841$
<i>Datura stramonium</i>	$r = 0.030, p = 0.934$	$r = 0.164, p = 0.651$
<i>L. trilineata</i> vs <i>D. stramonium</i>	$r = 0.636, p = 0.056$	$r = 0.768, p = 0.009$

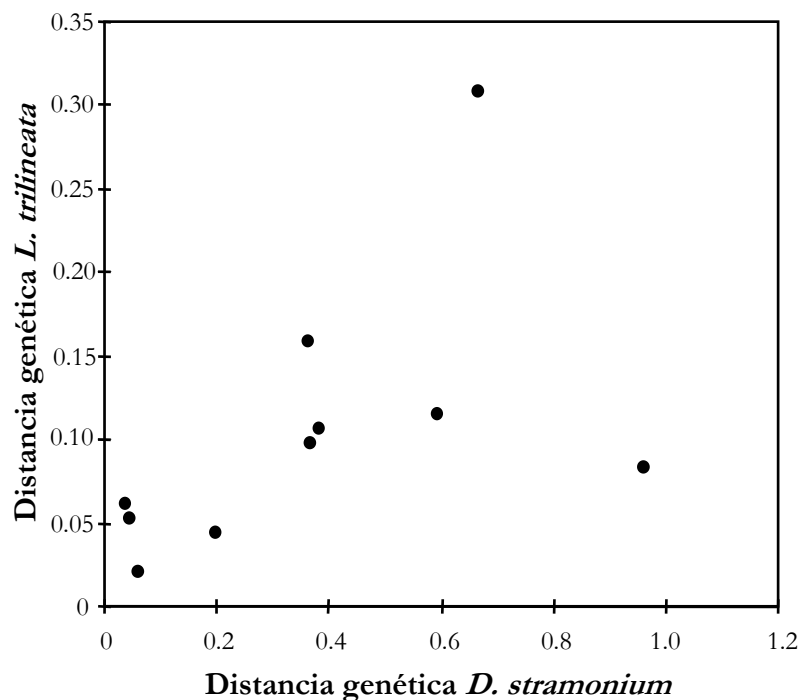


Figura 8. Correlación de distancias genéticas para las 5 poblaciones de la cuenca del Pánuco (Grupo 1) de *D. stramonium* y *L. trilineata*

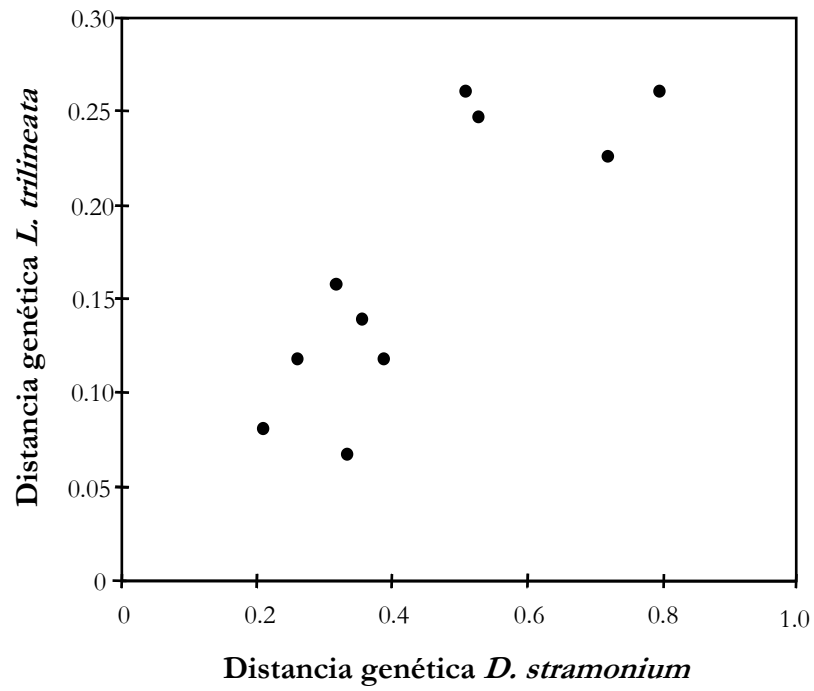


Figura 9. Correlación de distancias genéticas para las 5 poblaciones de la Cuenca del Balsas (Grupo2) de *D. stramonium* y *L. trilineata*.

## DISCUSIÓN

Los niveles de diversidad genética estimados mediante el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigosidad y los valores de  $F_{IS}$  (%P = 60,  $H_O = 0.3169$ ;  $F_{IS} = -0.3110$ ) muestran para *D. stramonium* un exceso de heterócigos; mientras que para *L. trilineata* (%P = 71,  $H_O = 0.1063$ ;  $F_{IS} = 0.3248$ ) se detectó mayor porcentaje de polimorfismo y menos heterócigos de los esperados. Estas diferencias en polimorfismo, y en particular en el valor de  $F_{IS}$  pueden reflejar diferencias en los sistemas de apareamiento. *D. stramonium* presenta niveles elevados de auto-polinización (Motten y Antonovics 1992; Núñez-Farfán et al. 1996; Stone y Motten 2002), probablemente por esa razón existan dos poblaciones con un solo loci polimórfico que son Límite y Ticumán. Por otro lado, *L. trilineata* es una especie dioica, lo que puede explicar el mayor grado de polimorfismo dentro de las poblaciones.

El valor negativo de  $F_{IS}$  para *D. stramonium* puede ser explicado por heterocigosidad fija detectada en cuatro loci en varias poblaciones. La heterocigosidad fija en microsatélites ha sido descrita en plantas con poliploidia y en aquellas que presentan apomixis (Richards 1997). Sin embargo, para el caso de *D. stramonium* no se ha registrado presencia de poliploidia, ni de apomixis (Núñez-Farfán et al. 1996). En tres especies del género *Datura* se ha descrito la existencia de círculos cromosómicos como resultado de translocaciones múltiples en 5 de los 12 pares de cromosomas presentes. Durante la translocación se intercambian segmentos de cromosomas no-homólogos formándose estos anillos. Este fenómeno, a su vez puede causar la presencia de heterocigosidad fija como una forma de evitar la aneuploidia (Belling y Blakeslee 1924; Bergner y Blakeslee 1932; Futuyma 2005).

Tanto para el herbívoro como para la planta se encontraron niveles significativos de estructuración genética, aunque la diferenciación entre poblaciones fue mayor para la planta ( $R_{ST} = 0.290$ ,  $F_{ST} = 0.265$ ) que para su herbívoro ( $F_{ST} = 0.1063$ ). Los resultados de este estudio

fueron consistentes con algunos estudios anteriores de estructura genética poblacional de huésped y parásito, en los cuales han encontrado mayor diferenciación en el hospedero que en el parásito (Michalakis et al. 1993; Multikainen y Koskela 2002). Los valores bajos de  $F_{ST}$  para el herbívoro indican mayor flujo génico entre poblaciones y posiblemente menor susceptibilidad a la deriva génica. A su vez, ambos procesos evolutivos juegan un papel importante en determinar el potencial de las especies para adaptarse localmente (Gandon et al. 1996). Aunque el flujo génico provee variación a las poblaciones, también puede reducir los efectos de la selección a nivel local homogeneizando la variación entre poblaciones. Estudios recientes han detectado niveles variables de adaptación en el insecto en relación a su hospedero, sugiriendo que el flujo génico parece no ser suficientemente alto para restringir la adaptación local (Fornoni et al. 2003; 2004; Garrido y Fornoni 2006). También se ha detectado adaptación local de la planta en caracteres de defensa contra herbívoros (Fornoni et al. 2003; 2004). Estas evidencias de adaptación local son probablemente consecuencia de una fuerte selección en el efecto de la planta sobre el herbívoro y viceversa.

La dinámica coevolutiva para el sistema de estudio ocurre a una escala geográfica pequeña ( $60\text{km}^2$ ) y de manera diferencial entre regiones promoviendo la existencia de un mosaico geográfico en la interacción (Althoff y Thompson 2005; McCoy et al. 2005). Tanto para *D. stramonium* como para *L. trilineata* no se detectó un patrón de aislamiento por distancia sugiriendo que los patrones geográficos de diferenciación podrían estar afectados por la deriva génica o bien el flujo entre las poblaciones responde a un patrón en función de la altitud o ecología que no fue detectado. La estructura poblacional de plantas y enemigos naturales son no solo el reflejo de las características genéticas y de historia de vida de cada uno sino también de la interacción entre ambos (Price 1980). La correlación de las distancias genéticas de *D. stramonium* y *L. trilineata* utilizando las trece poblaciones tampoco mostró una correlación



positiva significativa. Estudios previos han explicado la ausencia de un patrón de correlación en las estructuras genéticas como resultado de la escala geográfica a la cual se hizo el análisis (Dybdhal y Lively 1996; Mutikainen y Koskela 2002) ya que la presencia de barreras geográficas pueden condicionar la migración y la relación lineal entre las distancias genética y geográfica (Templeton 2006; Dupanloup et al. 2002).

Para explorar si la escala geográfica puede afectar los patrones de aislamiento por distancia y la correlación genética entre ambas especies se rehicieron los análisis considerando barreras orográficas e hidrográficas. La heterogeneidad orográfica de México debida a la presencia de cadenas montañosas y volcanes, particularmente en la zona central, favorece la formación de barreras geográficas que producen zonas con condiciones ambientales diferentes o bien dificultan la migración. Esta heterogeneidad se refleja en la presencia de treinta y tres cuencas hidrológicas en la Republica Mexicana (INEGI), muchas de ellas separadas desde el Triásico, las cuales también han influido en la distribución de tipos de vegetación y biodiversidad (Rzendowski 1978).

Al considerar el límite superior en altitud de la distribución de *D. stramonium* y *L. trilineata* y su relación con cuencas hidrológicas se encontró que dos grupos de poblaciones se localizaron en dos de las cuencas hidrológicas más importantes del centro de México (Cuenca del Balsas y Cuenca del Pánuco). Para las poblaciones de la Cuenca del Balsas se detectó una correlación positiva significativa de las estructuras genéticas de la planta y el herbívoro ( $r=0.768$ ,  $p=0.0090$ ) y para las poblaciones de la Cuenca del Pánuco la correlación fue marginalmente significativa ( $r=0.636$ ,  $p=0.056$ ). La ausencia de aislamiento por distancia para ambos grupos sugiere que constituyen sitios donde el flujo génico no impediría que evolucionen patrones de diferenciación y adaptación recíproca entre las especies. La evidencia previa indica que en general, solo en aquellos sistemas hospedero–parásito donde el sistema de

dispersión del parásito está anidado en el del hospedero se detectó estructuración poblacional correlacionada (Dybdahl y Lively 1996; Nadler et al 1990; Parker y Spoerke 1998). Sin embargo, en la mayoría de los casos examinados no se ha detectado una asociación positiva (Michalakis et al. 1993; Martínez et al. 1999; Multikainen y Koskela 2002; Delmotte et al. 1999; Jerome y Ford 2002; McCoy et al. 2005).

En particular, los trabajos de genética de poblaciones para sistemas planta-herbívoro no han encontrado una correlación positiva significativa entre las distancias genéticas poblacionales de las especies. Por ejemplo, Michalakis et al. (1993) encontraron que la planta huésped presentó mayor estructuración genética que las poblaciones del herbívoro, siendo probablemente la alta tasa de migración del herbívoro la responsable de la falta de correlación. En otro estudio Ren et al. (2008) encontraron los mismos niveles de diferenciación pero la presencia de múltiples hospederos pudo haber atenuado la posibilidad de detectar una correlación de las estructuras genéticas. En ninguno de los casos anteriores se observó aislamiento por distancia en ambas especies. Teóricamente, cuando las especies interactuantes presentan estructuras genéticas similares y aislamiento por distancia existe mayor probabilidad de encontrar una correlación genética entre las especies. Sin embargo, estas no son condiciones necesarias para detectar un patrón. Por ejemplo, Parker y Spoerke (1998) encontraron que la distribución de los genotipos de una leguminosa y una bacteria simbiote fijadora de nitrógeno muestran un patrón no aleatorio aunque no se observó aislamiento por distancia en ninguna de las dos especies (Parker y Spoerke 1998). Este ejemplo ilustra como la selección del huésped sobre el parásito y viceversa pueden jugar un papel importante en la determinación de los patrones de correlación de las estructuras genéticas de especies que interactúan.

En este estudio el hecho de observarse una correlación de las estructuras genéticas de la planta y el herbívoro a pesar de no encontrar un patrón de aislamiento por distancia, sugiere

que los marcadores utilizados pueden haber estado asociados con loci bajo selección contrarrestando el efecto del flujo génico y la deriva. Dado que en las poblaciones de la planta podría estar actuando la deriva génica, es posible que el herbívoro no afecte directamente su estructura genética pero que colonice las poblaciones de la planta acoplándose a su patrón de diferenciación (Garrido y Fornoni 2006). Si el herbívoro tiene un efecto importante sobre su huésped se esperaría una mayor diferenciación genética en el huésped (Price 1980, Koskela 2002). La comparación de  $H_O$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$  entre poblaciones de *D. stramonium* con y sin *L. trilineata* no mostraron diferencias significativas lo que sugiere que la interacción con *L. trilineata* no está promoviendo cambios en la diversidad genética (Koskela 2002). Sin embargo en este estudio solo se analizaron 5 poblaciones en las que *L. trilineata* no está presente y su ubicación geográfica sugiere que podría haber efectos ambientales que no se controlaron.

Los resultados de este estudio encontraron evidencia de que a una escala geográfica pequeña (distancias entre poblaciones menores a 150km) el flujo génico no operaría como una restricción pero la adaptación local reciproca de las poblaciones. Por lo tanto, en la ausencia de otras restricciones (ausencia de variación genética en caracteres involucrados en la interacción) se esperaría que dentro de los grupos de poblaciones de cuenca del Balsas y del Pánuco se presentaran patrones de adaptación local como resultado de la interacción. Dado que estudios previos han demostrado adaptación local tanto para la planta como para el herbívoro en caracteres involucrados en la interacción (Fornoni et al. 2003; Garrido y Fornoni, datos no publicados), la evidencia disponible para el sistema de estudio sugiere que podría ocurrir un proceso coevolutivo a nivel local en algunas poblaciones estudiadas del centro de México.

## BIBLIOGRAFIA

- Althoff, D. M. y J. N. Thompson. 2005. Comparative geographic structures of two parasitoid-host interactions. **Evolution** **53**:818-825.
- Anderson, B. I. Olivieri, M. Lourmas y B. A. Stewart. 2004. Comparative population genetic structures and local adaptation of two mutualist. **Evolution** **58**: 1730-1747.
- Belling, J. y A. F. Blakeslee. 1924. The configurations and sizes of the chromosomes in the trivalents of 25- chromosome daturas. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **10**:116-120.
- Berenbaum, M. R. y A. R. Zangerl. 1998. Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **95**: 13743-13748.
- Bergner, D. y A. F. Blakeslee. 1932. Cytology of the ferox- *Quercifolia* – stramonium triangle in *Datura*. **Genetics** **12**: 151-159.
- Burdon, J. J. y P. H. Thrall. 1999. Spatial and temporal patterns in coevolving plant and pathogen associations. **Am. Nat.** **153**: S15-S33
- Delmotte, F., E. Bucheli y J. A. Shykoff. 1999. Host and parasite population structure in a natural plant-pathogen system. **Heredity** **82**: 300-308.
- Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Mol. Ecol.** **11**: 2571-2581.
- Dybdahl, M. F. y C. M. Lively. 1996. The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite. **Evolution** **50**: 2264-2275.
- Ehrlich, P. R. y P. H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution** **18**: 586-608.
- Fornoni, J., P. L. Valverde y J. Núñez-Farfán. 2003. Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies of two natural populations of *Datura stramonium*. **Evol. Ecol. Res.** **5**: 1049-1065.

Fornoni, J., P. L. Valverde y J. Núñez-Farfán. 2004. Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. **Evolution** **58**: 1696-1704.

Futuyma, D. J. 2005. **Evolution**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Futuyma, D. J. y M. Slatkin. 1983. Introduction. En: D. J. Futuyma y M. Slatkin (eds) **Coevolution**. Sinauer Associates. Inc.

Gandon, S., Y. Capowiez, Y. Dubois, Y. Michalakis e I. Olivieri. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. **Proc. R. Soc. Lond. B** **263**: 1003-1009.

Gandon, S. Y. y Y. Michalakis. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. **J. Evol. Biol.** **15**: 451-462.

García, E. 1981. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen**.

Garrido, E. E. y J. Fornoni. 2006. Host tolerance does not impose selection on natural enemies. **New phytol.** **170**: 609-614.

Goldstein, D. B. y D. D. Pollock. 1997. Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **J. Hered.** **88**: 335-342.

Hebert, P. D. N. y M. J. Beaton. 1993. **Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical Handbook**. Helena Laboratories, Beaumont Tx.

Jerome, C. y B. Ford. 2002. Comparative population structure and genetic diversity of *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) and its Pinus host species: insight into host-parasite evolution in parasitic angiosperms. **Mol. Ecol.** **11**: 407-420.

- Kogan M. y R. Goeden. 1970. The sistematic status of *Lema trilineata*, New name with notes on the morphology of chemoreceptores of adults (Coleoptera: Chrisomelidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** **63**: 529-537.
- Koskela, T. 2002. Variation in life-history traits among *Urtica dioica* populations with different history of parasitism by the holoparasitic plant *Cuscuta europaea*. **Evol. Ecol.** **16**: 433-454.
- Krasfur. E. S. 1999. Allozyme gene diversities in some leaf beetles (Coleoptera:Chrysomelidae). **Biochem. Genet.** **37**: 215-226.
- Lenormand, T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. **Trends Ecol. Evol.** **17**: 183-189.
- Li, C. C. y D. G. Horovitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **Am. J. Hum. Genet.** **5**: 107-117.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Res.** **27**: 209-220.
- Martinez, J. G., J. J. Soler, M. Soler, A. P. Moller y T Burke. 1999. Comparative structure and gene flow of a brood parasite, the great spotted cuckoo (*Clamator glandarius*), an its primary host, the magpie (*Pica pica*). **Evolution** **53**: 269-278.
- McCoy, K. D., T. Boulinier y C. Tirard. 2005. comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. **Mol. Ecol.** **14**: 2825-2838.
- Michalakis Y. y L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetic** **142**: 1061-1064.
- Michalakis, Y, A. W. Sheppard, V. Noël e I. Olivieri. 1993. Population structure of a herbivorous insect and its host plant on a microgeographic scale. **Evolution** **47**: 1611-1616.

- Motten, A. E. y J. Antonovics. 1992. Determinants of outcrossing rate in a predominantly self-fertilizing weed *Datura stramonium* (Solanaceae) **Am. J. Bot.** **79**: 419-427.
- Multikainen, P. y T. Koskela. 2002. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. **Heredity** **89**: 318-324.
- Mulvey, M., J. M. Aho y C Lydeard. 1991. Comparative population genetic structure of parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. **Evolution** **45**: 1628-1640.
- Nadler, S. A. 1995. Microevolution and genetic structure of parasite population. **J. Parasitol.** **81**: 395-403.
- Nadler, S. A., M. S. Hafner, J. C. Hafner y D. J. Hafner. 1990. Genetic differentiation among chewing louse populations (Mallophaga:Trichodectidae) in a pocket gopher contact zone (Rodentia:Geomyidae). **Evolution** **44**: 942-951.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. **Am. Nat.** **106**: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** **89**: 583-590.
- Núñez-Farfán, J. y R. Dirzo. 1994. Evolutionary Ecology of *Datura stramonium* L. In Central Mexico: Natural Selection for Resistance to Herbivorous Insects. **Evolution** **48**: 423-436.
- Núñez-Farfán, J, R. A. Cabrales-Vargas y R. Dirzo. Mating System Consequences on Resistance to Herbivory and Life History Traits in *Datura stramonium*. **Am. J. Bot.** **83**: 1041-1049.
- Parker M. A. y J. M. Spoecke. 1998. Geographic structure of lineage associations in a plant-bacterial mutualism. **J. Evol. Biol.** **11**: 549-562.
- Price, P. W. 1980. **Evolutionary biology of parasites**. Princeton University Press.

- Ren, Z., B. Zhu, D. Wang, E. Ma, D. Su y Y. Zhong. 2008. Comparative population structure of chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host- plant *Rhus chinensis*. **Genetica** **132**: 103-112. 1981.
- Rzendowski, J. 1994. **Vegetación de México**. Sexta ed. Limusa Noriega Editores.
- Richards, A. J. 1997. **Plant breeding systems**. The University Press.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from  $F$ -statistics under isolation by distance. **Genetics** **145**: 1219-1228.
- Shonle, I. y J. Bergelson. 2000. Evolutionary ecology of tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). **Evolution** **54**: 778-788.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** **139**: 457-462.
- Smouse, P. E., J. C. Long y R. R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. **Syst. Zool.** **35**: 627-632.
- Stone J.L. y A. F. Motten. 2002. Anther-stigma separation is associated with inbreeding depression in *Datura stramonium* a predominantly sel-fertilizing annual. **Evolution** **56**: 2187-2195.
- Templeton, A. R. 2006. **Population genetics and macroevolutionary theory**. Wiley-Liss and John Wiley & Sons., Inc. Publication.
- Thompson, J. N. 1988. Coevolution and alternative hypotheses on insect/plant interactions. **Plant Ecol.** **99**: 893-895.
- Thompson, J. N. 1999. Coevolution and escalation: are ongoing coevolutionary meanderings important. **Am. Nat.** **153**: S92-S93.
- Thompson, J. N. 2005. **The geographic mosaic of coevolution**. The University of Chicago Press.



Valverde, P. L., J. Fornoni y J. Núñez-Farfán. 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium* equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. **J. Evol. Biol.** **16**: 127-137.

Vázquez-Lobo, A. 1996. **Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus* L : Implementaciones de técnicas moleculares y resultados preliminares.** Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Weaver, S. E. y S. I. Warwick. 1984. The biology of Canadian weeds.64. *Datura stramonium* L. **Can. J. Plant Sci.** **64**: 979-991.

Weir, B. S. y C. C. Cockerman. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**: 1358-1370.

Winkler y C. Mitter. 2008. The pylogenetic dimension of insect-plant interactions: A review of recent evidence. En: K. J. Tilmon (ed). **Specialization, speciation and rediation: the evolutionary biology of herbivor insects.** University of California Press.

Workman, D. L. y J. D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes II. Local differentiation in the Papago. **Am. J. Hum. Genet.** **22**:24-49.

Wright, S. 1922. coefficients of inbreeding and relationship. **Am. Nat.** **56**: 336-338.

## APENDICE I

Buffers de corrida y tinción utilizados para el estudio de genética de poblaciones de *Lema trilineata*. (Hebert y Beaton, 1993)

### **Buffer de corrida CAAPM pH 7.0**

42.0 grs. Ácido Cítrico.

50.0 ml 4-(3aminopropyl) morpholine

Hacer un litro, diluir 1:4 CAAPM buffer: agua para usar.

### **Arginine kinasa (ARK) EC. 2.7.3.3.**

0.5ml Tris HCl pH=8.0

1.5µl NAD

5 gotas de MgCl<sub>2</sub>

5 gotas Fosfo-L- arginina

5 gotas solución de ADP- D- glucosa

5 gotas MTT

5 gotas PMS

10 µl hexokinasa

10 µl G6PDH

2.0 ml Agar

### **Esterasa (Est) EC. 3.1.1.1.**

2.0 ml 0.1M Tris maleato pH=5.3

200 µl α-naphtyl acetato en acetona

10 gotas Fast blue RR sal

2.0 ml Agar

### **Glucosa- 6- fosfato dehidrogenasa (G6PDH) EC. 1.1.1.49.**

0.6 ml Tris HCl pH=8.0

1.5 ml NADP

12 gotas D-glucosa- 6- fosfato

6 gotas MgCl<sub>2</sub>

5 gotas MTT

5 gotas PMS

2.0 ml Agar

### **Glucosa – 6- fosfato isomerasa (GPI) EC. 5.3.1.9.**

1.0ml Tris HCl pH=8.0

1.5ml NAD

5 gotas Fructosa – 6 – fosfato

5 gotas MTT

5 gotas PMS

10 µl G6PDH

2.0ml Agar

**Isocitrato dehidrogenasa (IDH) EC. 1.1.1.42.**

1.0ml Tris HCl pH=7.0  
1.5ml NADP  
15 gotas DL- Ácido Isocítrico  
8 gotas MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2.0ml Agar

**Malato dehidrogenasa (MDH) EC. 1.1.1.37.**

1.0ml Tris HCl pH=8.0  
1.5ml NAD  
13 gotas sustrato málico  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2.0ml Agar

**Enzima málica (EM) EC. 1.1.1.40.**

0.6ml Tris HCl pH=8.0  
1.5ml NADP  
12 gotas sustrato málico  
2 gotas MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2.0ml Agar

**Manosa – 6 – fosfato isomerasa (MPI) EC. 5.3.1.8.**

1.0ml Tris HCl pH=8.0  
1.5ml NAD  
5 gotas D- Manosa – 6 – fosfato  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
5 µl PGI  
20 µl G6PDH  
2.0 ml Agar

**6- fosfogluconato dehidrogenasa (6PGDH) EC. 1.1.1.44.**

0.6ml Tris HCl pH=8.0  
1.5ml NADP  
6 gotas 6- ácido fosfogluconico  
6 gotas MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2.0 ml Agar

**0.1M tris maleato pH=5.3**

1.2g trizma base  
1.2g maleic acid

2.4ml 1M NaOH  
Aforar a 100ml

**0.09M tris HCl pH=8.0**

44.4g trizma base  
248ml 1M HCl  
Aforar a 4L.

**0.09M tris HCl pH=7.0**

44.4g trizma base  
350ml 1M HCl  
Aforar a 4 litros

**Agar**

4.0g agar grado bacteriológico  
250ml de agua

**Sustrato málico**

180ml agua  
20ml tris HCl pH=9.0  
3.68 gm L-Malic ácido  
Ajustar a pH=8.0

**Solución ADP-D Glucosa**

0.10g ADP  
3.15g D-glucosa  
10.0ml agua

**Solución  $\alpha$ -naphthyl acetato.**

10ml agua  
10ml acetona  
0.1g  $\alpha$ -naphthyl acetato

## Apéndice II

### Extracción de ADN en plantas

#### Método “miniprep” (Modificado por Vázquez-Lobo 1996)

1. En un mortero moler alrededor de 1g de tejido y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminar el máximo de fibras.
2. Agregar 1ml de buffer CTAB 2x.
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5ml y centrifugar a 10000 rpm durante ocho minutos a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600µl de CTAB 2x (agitar hasta despegar el tejido). Incubar en un baño a 60°C durante 10 minutos.
5. Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo:octanol 24:1 agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 minutos a 4°C (10 a 15 minutos, hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Trasladar el sobre nadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 µl ) este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la diafase que se forma.
7. Precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (500µl aproximadamente) de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 a 12 horas a -20°C.
8. Centrifugar a 9000 rpm durante cinco minutos a 4°C. eliminar el sobrenadante.
9. Limpiar el pellet agregando 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugado a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 µl de agua.

-Buffer de extracción CTAB 2x

2 ml EDTA pH 8.0 0.5M

10 ml Tris-HCl pH 8.0 1M

28 ml de NaCl 5M

2g CTAB

300 µl de 2-mercaptoetanol justo antes de usar el buffer.

Aforar a 100ml.

-Tris- HCl pH8.0, 1M

121.1 gr tris

800 ml agua bidestilada

Ajustar pH a 8.0 afurar a 1lt

### Apéndice III

Técnica de geles de acrilamida para visualizar variación en microsátélites.

Pueden usarse geles desnaturalizantes y nativos

Para geles nativos:

Para cámara pequeña (vidrios de 16 x 14 cm).

Gel al 8%

5.4 ml Acrilamida 19:1 ó 29:1

5.4 ml Buffer TBE 5x

16.8 ml Agua destilada

140  $\mu$ l APS 25%

14  $\mu$ l TEMED

A las muestras se les agrega 1/3 de volumen de loading buffer.

Se coloca el gel en la cámara, se llena con buffer TBE 1x

Se cargan 10  $\mu$ l de la muestra. Los geles se corren a 150 Volts durante el tiempo necesario para el microsátélite.

---

Geles desnaturalizantes:

Para preparar el gel.

Se mezclan 28 ml de acrilamida 6% Urea 7M, 85  $\mu$ l de APS 10%, 23 $\mu$ l de TEMED.

Preparación de corrida

Se limpian los pozos eliminando excesos de urea.

Se precorre el gel durante 20 minutos a 100 volts

A las muestras se les agrega 1/3 del buffer de carga, se desnaturalizan a 95°C por 5 minutos y se enfrían inmediatamente.

Se cargan 6  $\mu$ l de muestra en cada pozo. Se corre el gel a 150 Volts el tiempo necesario para el microsátélite.

Tinción con AgNO<sub>3</sub>

La tinción tanto en geles nativos como desnaturalizantes fue:

Solución fijadora 100 ml 5'

Enjuagar 3 veces

Plata 100 ml de 7 a 10' (regresar a la botella)

Enjuagar 3 veces

Revelador 100 ml con 500 $\mu$ l de formaldehído el tiempo que sea necesario (tirar en desechos d acrilamida)

Enjuagar una vez con agua destilada

Solución detenedora 100 ml (tirar en desechos acrilamida)

-Acrilamida 6% Urea 7M

35ml agua destilada tibia  
10ml TBE10x  
42grs Urea  
15ml Acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 40%  
Se filtra con malla de 0.45 micrones, se afora a 100ml.

-Buffer de carga desnaturizante  
96 ml de formamida  
4ml EDTA 0.5M pH 8.0  
25mg Azul de bromofenol  
25mg xilene cianol

-Solución fijadora  
100ml alcohol  
5ml Ácido acético  
Aforar a 1L

-AgNO<sub>3</sub> al 0.2%

-Revelador 4x  
240g NaOH aforar a 2L  
Se diluye 1x para su uso

-Solución detenedora (Stopper)  
60g EDTA (dihidratado) aforar a 2L.

Apéndice IV(a). Coeficiente de estructura genética  $F_{ST}$  en las 13 poblaciones de *Lema trilineata* en México, en negritas se muestran los valores no significativos ( $p>0.05$ )

	Aca	Atl	Chig	Esp	Lim	Pt nva	Ped	Teo	Tgo	Tla	Tula	Val	Xal
Aca	-												
Atl	0.1840	-											
Chig	0.0648	0.2115	-										
Esp	0.1979	0.1359	0.0760	-									
Lim	0.0537	0.1138	0.0455	0.1247	-								
Pt nva	0.0659	0.2575	0.0472	0.2445	0.0760	-							
Ped	0.0701	0.1089	0.0705	0.1605	0.0455	0.1099	-						
Teo	0.0792	0.0689	0.0996	0.1255	0.0319	0.1055	0.0429	-					
Tgo	0.0804	0.0907	0.0860	0.0907	0.0413	0.1025	0.0487	<b>-0.0114</b>	-				
Tla	0.1625	0.0934	0.2053	0.0934	0.0964	0.2358	0.0945	0.0455	0.0502	-			
Tula	0.1103	0.1424	0.1331	0.1424	0.0892	0.1364	0.0735	0.0255	0.0196	0.0573	-		
Val	0.0742	0.2062	0.1677	0.2062	0.1112	0.2179	0.1289	0.0967	0.1003	0.1330	0.1657	-	
Xal	0.1215	0.1053	0.1529	0.1053	0.0702	0.1934	0.0611	0.0345	0.0352	0.0341	0.0762	0.0627	-



Apéndice IV (b). Coeficiente de estructura genética  $R_{ST}$  en las 18 poblaciones de *Datura stramonium* en México, en negritas se muestran los valores no significativos ( $p>0.05$ )

	Aca	Atl	Chig	Esp	Lim	Ptn	Ped	Sd	Tax	Teo	Tgo	Tic	Tla	Tula	Tzin	Val	Xal	Zir
Aca	-																	
Atl	0.4198	-																
Chig	0.3869	0.1784	-															
Esp	0.3467	0.2414	0.3611	-														
Lim	0.1030	0.5669	0.5246	0.5670	-													
Ptn	0.3470	<b>-0.001</b>	0.0861	0.1794	0.4899	-												
Ped	0.2769	0.6044	0.4198	0.6314	0.4087	0.4842	-											
Sd	0.2626	0.4052	0.3506	0.5389	0.2656	0.3558	0.4301	-										
Tax	0.4138	<b>-0.018</b>	0.1713	0.2474	0.5705	<b>-0.003</b>	0.6129	0.3932	-									
Teo	0.1446	0.3197	0.4329	0.1812	0.3306	0.2866	0.5623	0.3827	0.3156	-								
Tgo	0.1474	0.4172	0.3716	0.4885	0.1664	0.3721	0.3515	0.0410	0.4045	0.3140	-							
Tic	0.0741	0.3418	0.3554	0.1981	0.1988	0.2668	0.3893	0.3202	0.3391	<b>0.0507</b>	0.2521	-						
Tla	0.2857	0.4541	0.4026	0.5824	0.2762	0.3995	0.4671	<b>-0.011</b>	0.4432	0.4150	0.0437	0.3577	-					
Tula	0.2170	0.3167	0.2454	0.4593	0.2689	0.2679	0.3578	0.0079	0.3021	0.3278	0.0566	0.2656	0.0382	-				
Tzin	0.2403	0.0897	0.1540	0.2681	0.3492	0.0915	0.4345	0.1454	0.0760	0.2137	0.1814	0.1931	0.1952	0.0802	-			
Val	0.1758	0.3399	0.3381	0.4449	0.2071	0.3121	0.4076	0.0181	0.3241	0.2677	0.0056	0.2327	0.0274	0.0335	0.1094	-		
Xal	0.2634	0.2078	0.0404	0.2797	0.3795	0.1370	0.2697	0.2586	0.1969	0.3392	0.2730	0.2068	0.3109	0.1755	0.1208	0.2538	-	
Zir	0.2772	0.2064	0.0827	0.3853	0.3812	0.1504	0.3622	0.1344	0.1927	0.3540	0.1826	0.2610	0.1910	0.0605	0.0462	0.1447	<b>0.0318</b>	-